

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

「核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究」

研究年度終了報告書（令和5年度）

研究代表者：曾我慶介 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部

研究要旨：近年の食品種の多様化、世界各国からの食品の輸入量及びその安全性確保需要増加に伴い、食品遺伝子検査の需要も増すものと考えられる。現在の食品遺伝子検査はリアルタイム PCR がゴールドスタンダードになっているが、機械が高価かつ時間がかかることが問題視されていた。一方で、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は等温で数十分で反応が完了することから、定性検査法として医療分野では普及してきている。しかし、国内の食品遺伝子検査としては検討が進んでいないのが実情である。そこで本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応の現状の情報収集を行い、その中から実用的な方法を選択して、サンプリングから結果の解析までの流れを鑑みて食品行政に係る遺伝子試験としての適用性を評価し、試験法として開発することを目的とする。

本年度は、公的検査機関の遺伝子検査担当者を対象とした等温核酸増幅反応の需要調査を実施し、核酸等温増幅反応のメリット、オンサイト検査、現在の課題に関する情報収集を行った。遺伝子組換え食品、アレルギー分野では、通常の検査では迅速性が必要な半面、通知試験法と同等の感度・精度を有しなければ利用しにくいという意見が大多数であった。また、加工食品からの前処理時にカラムが詰まる等の現行通知試験法の問題点も多数意見があり、粗抽出 DNA で適用可能な方法も需要が見込まれた。微生物分野では、31.6%の検査員から、現行の検査法で困ることが有ると回答を得ると共に、37.9%の検査員からマルチプレックスを用いた検査法の必要性が有ると回答を得た。また、オンサイトでの検査需要に関しては、有ると回答した検査員は6.3%と低い結果であった。さらに、微生物検査法の改善を要するものとして、病原性大腸菌、ノロウイルス、カンピロバクターの順番で必要性が高いと感じている検査員が多いことが明らかとなった。

とうもろこし加工食品をモデルに、粗抽出 DNA の適用性を評価したところ、リアルタイム PCR、LAMP と比較して、RPA が最も食品マトリックスの適用範囲が広い結果が得られた。さらに、PCR が2時間かかるのに対し、同様の定性検査結果が30分未満でわかることから、DNA 簡易抽出から実施は検査の大幅の迅速化が見込まれる。微生物検査では、RPA でのサルモネラ及びカンピロバクターの検出を試みた。39℃、30分でRPA反応後、両菌の標的遺伝子を確認した結果、両菌共にDNA濃度0.5 pg から5 ng の間で、それぞれ遺伝子の増幅が確認された。さらに両菌が分離された鶏肉増菌液を用いて、簡易的 DNA 抽出後に両遺伝子の検出を行ったところ、緩衝ペプトン水増菌液からサルモネラ遺伝子は検出できなかったが、プレストン増菌液からカンピロバクター遺伝子は検出できた。サルモネラに関しては、更なる検討が必要であるが、カンピロバクターでは、選択増菌培地から標的遺伝子検出が可能であったことから、食品微生物分野に応用できる有用な手法であると考えられた。

次年度以降では、ラテラルフローアッセイへの RPA の適用性を評価し、検査法開発を検討する。

研究分担者

中山 達哉 広島大学大学院統合生命科学研究科 准教授

A. 研究目的

世界の食品安全性検査市場は 2022 年に 211 億米ドルと推定され、2027 年には 311 億米ドルに達し、8.1%の年次成長率になると予測されている (MarketsandMarkets 社報告、2022)。近年では、「培養肉」等の新規技術で開発された食品種が増えるとともに、世界の食品取引及び規制遵守を満たすための安全性確保需要も増加することから、結果的に食中毒等のリスクを低減し、かつ食品表示不正を防止するために世界各国で食品検査の需要が増すと考えられる。現在、国内輸入食品は全体の 1%程度を食品検査しているが、今後、益々輸入食品が増加することで検査率が低下し、それによる違反食品が日本市場に出回ることが懸念され、食品の安全を損なうことが危惧される。そこで、輸入食品が増加しても、検査率を低下させないために、効率的に行える迅速簡便法を用いた検査法の開発が必要と考えられる。

食品行政にかかる遺伝子検査（遺伝子組換え食品、アレルゲン、微生物）はリアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) がゴールドスタンダードになっている。その理由として、特異性が高いことおよび高感度なことが挙げられる。しかし、PCR はサーマルサイクラーを用いて一定温度の多段階ステップを複数サイクル繰り返す必要があるため、高価な機械が必要なこと及び結果を得るまでに数時間がかかることが課題であった。従って、今後はリアルタイム PCR と同等の特異性・感度・精度を有しつつ、より簡便で検査速度を向上させた試験法の開発が求められている。

近年、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、60-65°C の等温反応であり、インキュベーション時間も数十分と短時間で済むことから、世界的にも近年の Covid-19 検査などの感染症診断の分野で適用され始めており、我々も LAMP 法を用いた DNA 粗抽出法やラテラルフロー法の検討を進めている (Takabatake et al, 2018., Narushima et al, 2020)。

Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 20-45°C の反応温度でインキュベーション時間が最短 10 分未満という利便性を備えた核酸増幅であり、蛍光プローブで検出する方法に加え、CRISPR-Cas システムを応用した DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter (DETECTR) (Chen et al, 2018) 等は感染症診断分野での高感度検査法として特に注目されている。一般に等温核酸増幅反応では、用いる酵素類が夾雑物に強いという特徴もあることから、DNA 抽出も簡便な方法に代替できうる。しかしながら、食品行政に関わる公定検査法としての検討はあまり進んでいないのが実情である。

本年度は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応を用いた遺伝子検査の需要調査を、国内食品検査所、地方衛生研究所及び食肉衛生検査所を対象に実施する。需要調査の結果に基づき、粗抽出 DNA での等温増幅反応の適用性や、微生物分野での RPA を評価し、検査法としての有用性を評価する。

B. 研究方法

1. 等温増幅反応検査需要調査

地方衛生研究所及び検査所を対象とし、任意で回答可能なアンケート型の調査を実施した。検査項目としては、遺伝子検査実施例のある遺伝子組換え (GM) 食品検査、アレルゲン検査、自然毒検査別に、主に下記の 5 つの点に関して①核酸の抽出・精製法、②PCR との代替可能性、③オンサ

イト検査需要、④マルチプレックス検査需要、⑤その他困りごとに関して聞き取りを行った。微生物分野では地方衛生研究所、食肉衛生検査所及び検疫所の合計 95 カ所を対象とし、任意で回答可能なアンケート型の調査を実施した。検査項目としては、遺伝子検査実施例のある微生物分野について、①現行の検査法において困り事の有無、②マルチプレックスを用いた検査需要の有無、③オンサイト検査の需要の有無に関して調査した。

2. 試料

とうもろこし穀粒をミルサーで粉碎し、その粉末試料を 14 mg 測り取り、DNA 抽出用試料とした。とうもろこし加工食品モデルとして、市販のコーングリッツ 3 種およびスナック菓子 2 種を購入した。

RPA 法による菌の検出として、市販鶏肉から分離されたサルモネラ (*Salmonella enterica*) 及びカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) を使用した。また、東広島市で購入した市販鶏肉から、サルモネラ及びカンピロバクターを分離し、分離された鶏肉増菌液 (サルモネラでは緩衝ペプトン水 (BPW)、カンピロバクターではプレストン液体培地) をそれぞれ 1 袋使用して、サルモネラ及びカンピロバクターの遺伝子検出を行った。

3. DNA 簡易抽出法

(とうもろこし試料)

GenCheck® DNA Extraction Reagent (FASMAC 社) を用い、取扱説明書通りに実施した。試料に GenCheck® DNA Extraction Reagent を 140 µL 加え、ボルテックスで攪拌後、100℃で 10 分間加熱後、氷上で 1 分間冷却し、15,000×g、1 分間遠心後、上清を DNA 抽出液試料とした。

Template Prepper for DNA (ニッポンジーン社) を用い、取扱説明書通りに実施した。Template Prepper A 液を 70 µL 加えた後、室温で 5 分懸濁し、Template Prepper B 液を 70 µL 加え、100℃で 5 分間加熱した。その後、氷上で 2 分間冷却し、15,000

×g、5 分間遠心後、上清を DNA 抽出液試料とした。

既報 (Narushima et al, 2020) に従い、アルカリ試薬 (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA) を 70 µL 加え、10 秒間ボルテックスで攪拌後、中和試薬 (40 mM Tris-HCl, pH 5.0) を 70 µL 加え、軽く攪拌後 1 分間静置した。100℃で加熱 1 分間の有無、静置 (氷上、常温) 1 分後、15,000×g、1 分間遠心し、上清を DNA 抽出液試料とした。

(微生物)

カンピロバクターは CHROMagar Campylobacter、サルモネラは Nutrient agar 培地で前培養を行った後、カンピロバクターは 42℃、サルモネラは 37℃でそれぞれ 48 及び 24 時間培養後、白金耳により、菌塊を採取し、TE バッファーに懸濁した。懸濁した菌液は 95℃、10 分加熱した。その後、11,000g、10 分間で遠心し、上清を採取した。採取した上清は DNA 結合蛍光測定 QuantiFluor (Promega) によって DNA 量を測定した。

4. 核酸等温増幅反応

RPA 法

昨年度検討したとうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (SSIb) RPA 用プライマー及びプローブを用いた。TwistAmp exo (TwistDx 社) に含まれる試薬を用い、下記の通りに反応溶液を調製した。

Rehydration Buffer	29.6 µL
MQ	9.2 µL
Primer-F (10 µM)	2.0 µL (400 nM)
Primer-R (10 µM)	2.0 µL (400 nM)
Exo probe (10 µM)	0.8 µL (250 nM)

上記組成で PCR チューブ内に調製・混和し、2 個の PCR チューブにそれぞれ 21.8 µL ずつ分注した。分注した各チューブに DNA 抽出液を 2.0 µL 加えた後、蓋に MgOAc (280 mM) 1.2 µL を滴下し、遠心で落とすことで混合し、反応を開始した。等温増幅蛍光測定装置 GeneLyzer FIII (Canon メディカ

ルシステムズ社)を用いて37℃で30分間保温し、蛍光シグナルをリアルタイムで検出した。

RPA 法におけるサルモネラ及びカンピロバクター検出

RPA 法に用いるプライマーはサルモネラ及びカンピロバクターとも論文報告のある RPA 用プライマーを用いた。サルモネラは 188bp 増幅を可能とする *invA/E* 遺伝子を標的にしたもの、カンピロバクターは 254bp 増幅を可能とする *hipO* 遺伝子を標的するものをデザインした。また、サルモネラ及びカンピロバクターの DNA 量は、1 ng/μL から 0.001 pg/μL まで希釈系列を作製し、DNA テンプレートとして使用した。さらに、TwistAmp exo (TwistDx 社)に含まれる試薬を用い、反応溶液を下記の通りに調製した。

Primer free rehydration buffer	14.8 μL
Super-purified Water	8.2 μL
Primer-F (10 μM)	1.2 μL
Primer-R (10 μM)	1.2 μL
280mM MgOAC	1.25 μL

上記組成で PCR チューブ内において十分にピペッティングした後、DNA テンプレートを 5 μL 加え、反応を開始した。39℃、30 分反応後に、10 μL の反応液をアガロースゲル 1.5%に滴下し、電気泳動を行った。電気泳動後に、増幅遺伝子を確認した。本実験は、1 検体あたり 3 回繰り返して実験を行った。

RPA 法における鶏肉増菌培養液からのサルモネラ及びカンピロバクター検出

市販鶏肉 25 g を BPW225 mL に混合し、ストマッカー処理後に 37℃、24 時間培養し、その後 4℃で約 1 週間保管した増菌培養液をサルモネラ検出に使用した。一方、ストマッカー処理後に 1 mL をプレストン培地 9 mL に滴下し、42℃、48 時間培養した後、4℃で約 1 週間保管した培養液をカンピロバクター検出に使用した。それぞれの増菌培養液は、4℃で保管される前に、サルモネラは BPW

増菌培地から Rappaport-Vassiliadis 液体培地、さらに CHROMagar Salmonella 寒天培地に塗抹され、サルモネラが分離されたもの。カンピロバクターはプレストン増菌培地から CHROMagar Campylobacter 寒天培地に塗抹され、カンピロバクターが分離されたものを、それぞれ 1 袋使用した。それぞれの増菌培養液を 1 mL 採取し 95℃、10 分で煮沸法による DNA 簡易抽出をし、11,000g、10 分間遠心後、上清を採取した。前述した RPA 法によるサルモネラ及びカンピロバクター検出と同様条件、39℃、30 分にて RPA 反応を行った。反応後、10 μL をアガロースゲル 1.5%に滴下し、電気泳動を行い、増幅遺伝子を確認した。本実験は、1 検体あたり 2 回繰り返して実験を行った。

LAMP 法

とうもろこしの内在性遺伝子 SSIIb 用プライマーは、PrimerExplorer (栄研化学社)を用いて作成された。ポリメラーゼはニッポンジーン社製の LAMP MASTER を用い、下記の通りに反応溶液を調製した。

・10×LAMP プライマー Mix

50 μM FIP	31 μL	(16 μM)
50 μM BIP	31 μL	(16 μM)
50 μM F3	4 μL	(2 μM)
50 μM B3	4 μL	(2 μM)
50 μM LoopP F	16 μL	(8 μM)
50 μM LoopP B	16 μL	(8 μM)
1M Tris-HCl(pH8.0)	1 μL	(10 mM)
1M DTT	1 μL	(1 mM)
Total	100 μL	

・反応溶液調製 (1 ウェル当たり)

DNA 抽出液	2 μL
2×LAMP MASTER	12.5 μL
10×LAMP プライマー Mix	2.5 μL
10×インターカレータ Mix	2.5 μL
MQ	5.5 μL
Total	25 μL

反応は等温増幅蛍光測定装置 GeneLyzer FIIIを用いて 65℃で 30 分間保温し、蛍光シグナルをリアルタイムで検出した。融解曲線分析では、1 秒当たり 0.05℃のスピードで 98℃から 80℃まで温度を下降させ、蛍光シグナルデータを取得した。

リアルタイム PCR 法

とうもろこしの内在性遺伝子 SSIIb 用プライマーは消費者庁通知試験法「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」で採用されているものを用いた。

・反応溶液調製 (1 ウェル当たり)

FastStartProbeMaster	12.5 μL
Primer-F (50 μM)	0.4 μL (800 nM)
Primer-R (50 μM)	0.4 μL (800 nM)
Probe (10 μM)	0.25 μL (100 nM)
DNA 抽出液	2 μL
MQ	9.45 μL
Total	25 μL

反応では 50℃2 分、95℃10 分で加熱後、95℃30 秒→59℃1 分のサイクルを 45 サイクル繰り返した。PCR は LightCycler480 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いて実施し、蛍光シグナルをリアルタイムで検出した。

C. 研究結果

1. 等温増幅反応検査需要調査(GM 食品・アレルゲン)

GM 食品とアレルゲンの検査は、試料サンプリングから DNA を抽出する行程が共通する部分が多いため、同項で述べる。地方衛研からは、GM 食品 31 機関 (回答 35 件)、アレルゲン 32 機関 (回答 43 件) からの回答を得た。検疫所からは GM 食品 2 機関 (回答 4 件) からの回答を得た。以上を合算して集計した。

DNA 抽出法に対する不便さを訴える回答が GM 検査担当からは 46%、アレルゲン担当からは 40% に上った。特に意見が多かったのは、現在の公定

法に収載されているカラムを用いた DNA 抽出法に関するもので、加工食品等に適用した際にカラムが詰まってしまい時間がかかり作業が煩雑になる点であった。また、コストがかかる点も問題点として挙げられた。

20 分前後で反応が終了する核酸等温増幅反応による地方衛研の業務改善可能性に関しては、「改善される」と回答されたのは 40%に留まり、「不明」あるいは「改善されない」と回答されたのは 60%に上った。核酸等温増幅反応の試験導入に関する意見を表にまとめた。迅速性は有用とされる半面、PCR の反応時間 (2 時間) は別作業に時間を取れること、迅速性よりも正確性が問われるため PCR と同等の感度・特異性を有するか現時点で不明なこと、装置・実施経験が無く判断ができないこと等が「不明」または「改善されない」という回答が多い原因として挙げられた。また、新しく標準手順書を作成する手間がある等の新技術導入への抵抗を示す回答も見られた。迅速な点でのメリットが想定されても、その他の懸念点が払拭されない限りは総合的に見た場合のデメリットが大きいと考えられるようである。地方衛研や検疫所では公定法に準じた業務を実施することから、感度、精度の観点で公定法との同等性が担保されない場合は導入メリットが低いとされる傾向にあった。

オンサイト需要に関しては、地方衛研の業務では「需要無し」あるいは「わからない」と回答した割合が 94%に上った。一部の意見で、保健所との連携業務では嘔吐物や加工食品からのアレルゲンのオンサイト検査や、製造業者の自主点検や収去前の簡易検査等のニーズは有りうると回答された。

マルチプレックス検査の需要に関しては、28%の回答者から需要があり、その内約はアレルゲン検査の特定原材料 8 種の同時検査需要が高く、6割に上り、続いて GM 大豆検査、GM バレイショ検査と続いた。

困っていることの有無を問うアンケートでは、困っていることがあると答えた回答は全体の54%に上った。加工度の高い食品に対する適切な前処理法が確立されていない点や、キットや試薬の高騰が主な問題として挙げられた。地方衛研では、理化学分析の中でも遺伝子検査の割合が低いところもあり、技術習得やその継承、および予算確保に関する問題点も確認された。また、検査法の通知されたタイミングにより、従来PCRからリアルタイムPCR、核酸クロマト技術まで試験項目によって、技術的な差が見られ、DNA抽出キット、PCR試薬等も統一されていない点で指摘があり、全体の通知試験法のバランスを考慮した見直しの必要性について問われた。

2. 等温増幅反応検査需要調査（自然毒）

地方衛研からは24機関（回答28件）からの回答を得た。

自然毒の遺伝子検査では国で定める公定法が存在しないため、各地方衛生研究所が各地域の需要に応じて検査を実施している。DNA抽出に対する不便さは43%を占めた。オンサイト検査需要に関しては「需要あり」と回答したのは14%であった。検査対象が地域特有なことも特徴的であり、ツキヨタケ、トリカブト、ホンシメジ等が挙げられた。マルチプレックス検査の需要に関しては「需要あり」と回答したのは18%に留まり、「無し」と回答されたのは60%弱に上った。またその検査対象もクワイズモ等の地域特有な植物が挙げられた。国立医薬品食品衛生研究所生化学部の公開している植物性自然毒データベース [MushPlant \(https://mushplant.go.jp/\)](https://mushplant.go.jp/) の存在を知っていると回答したのは全体の54%であった。自然毒データベースへの意見として、各種データの拡充が挙げられた。

3. 等温増幅反応検査需要調査（その他）

上記に挙げられた検査対象として、寄生虫、フグ等の有毒魚の判別等も実施されているが、データ処理の煩雑さから同定までが困難という意見が見られた。

4. その他要望について

GM食品、アレルゲン、自然毒の遺伝子検査に関する総合的な要望を表に示した。遺伝子検査も検査頻度が低いことから、技術研修会の要望が意外に多いことがわかる。また、通知試験法に関する情報開示や改善要望が多かった。核酸等温増幅反応のような簡易方法の開発要望も含まれていた。

5. 等温増幅反応検査需要調査（微生物）

全95施設から回答を得た結果、現行の検査法で困ることが有ると答えた割合は31.6%（30/95）であることが判明し、困ることとして、「検査法が煩雑である」「検査結果まで時間が要する」といったことが多かった。マルチプレックスを用いた検査需要に関しては、37.9%（36/95）で需要が有ると答えており、具体的な内容として、病原性大腸菌、カンピロバクター、ノロウイルスの分類に使えるものを希望するものが多かった。さらに、オンサイトでの検査需要に関しては、6.3%（6/95）で需要有りと回答を得た。特に、地方衛生研究所の検査員からは需要は低い結果であった。さらに、現行の微生物検査法において、改善を望むものとして、病原性大腸菌が最も多く、次いでノロウイルス、カンピロバクターの順であった。

病原性大腸菌では、病原性大腸菌の同定方法、O血清の分類方法、シガ毒素及び病原因子の検出方法に関する改善を望む回答が多く得られた。また、ノロウイルス及びカンピロバクターでは、同定と型別（ノロウイルスではG1、GI2、カンピロバクターでは *Campylobacter jejuni* か *Campylobacter coli*）に関する要望が多かった。

6. RPA 法、LAMP 法、リアルタイム PCR の簡易 DNA 抽出法を用いた溶出液での比較

今回、現在の遺伝子検査で最も利用されているリアルタイム PCR と核酸等温増幅反応の LAMP 及び RPA によって、粗抽出 DNA からの検出に関して、とうもろこし及びその加工食品を用いて検討した。

・とうもろこし粉末を試料とした場合

RPA 法では、GenCheck 法で 2 回抽出した DNA 液の一回と陰性コントロールとして用いた超純水では増幅が確認されなかったが、その他のサンプルからは、反応開始から 10～16 分間で増幅が確認された。

LAMP 法では、市販の簡易抽出試薬 2 種類を用いて抽出された DNA はいずれも反応開始 11～12 分台で増幅が確認された。蛍光強度は RPA より強い傾向であった。一方で、既報の方法を用いた場合は、早い時間では増幅が確認されなかったが、加熱無しの場合で 20 分後に増幅曲線の立ち上がりが確認された。

リアルタイム PCR 法では、超純水と成島らの方法を用いた場合は増幅が確認されなかったが、市販の簡易抽出試薬 2 種類を用いて抽出された DNA では、Cq 値 25～28 で増幅が確認された。

・コーングリッツを試料とした場合

コーングリッツは乾燥させたとうもろこしの皮と胚芽を取り除いた胚乳部分のみを粒状に粉碎したものである。油などを用いた調理による加工でないことから加工度は低い加工食品のモデルとして用いた。

RPA 法では、全 3 製品で GenCheck 及び Template Prepper を用いて抽出された DNA 溶液からは 10～12 分で増幅が確認された。既報の方法では熱処理を行わない方法を用いて抽出された DNA 溶液からは 12～16 分で増幅が確認された。

LAMP 法では、全 3 製品で GenCheck 及び Template Prepper を用いて抽出された DNA 溶液からは 11～13 分で増幅が確認されたが、既報の方法

(熱処理を行わない)を用いて抽出された DNA 溶液からは増幅が確認されなかった。

リアルタイム PCR では、LAMP 法同様に、全 3 製品で GenCheck 及び Template Prepper を用いて抽出された DNA 溶液からは Cq 値 27～30 で増幅が確認されたが、既報の方法(熱処理を行わない)を用いて抽出された DNA 溶液からは増幅が確認されなかった。

・スナック菓子を試料とした場合

スナック菓子は食用油で揚げられており、加工度が高いとうもろこし加工食品モデルとして用いた。

RPA 法では、スナック菓子 A では全ての DNA 抽出法で増幅が確認され、GenCheck を用いて抽出された DNA 溶液からは 15 分後、既報の方法(熱処理を行わない)を用いて抽出された DNA 溶液からは 16 分後、Template Prepper を用いて抽出された DNA 溶液からは 20 分以降に増幅が確認された。一方、スナック菓子 B からは全ての抽出法で増幅が確認されなかった。

LAMP 法では、RPA 法同様にスナック菓子 A では全ての DNA 抽出法で得られた DNA 溶液から増幅が確認され(13～18 分後)たが、スナック菓子 B からは全ての抽出法で増幅が確認されなかった。リアルタイム PCR では、スナック菓子 A では GenCheck を用いて抽出された DNA 溶液からは Cq 値 31 台、既報の方法(熱処理を行わない)を用いて抽出された DNA 溶液からは Cq 値 33 台の増幅が確認されたが、Template Prepper を用いて抽出された DNA 溶液からは増幅が確認されなかった。スナック菓子 B からは全ての抽出法で増幅が確認されなかった。

7. RPA 法による微生物の検出

・サルモネラ及びカンピロバクター

本研究では、なるべく安価で簡易的な方法として、煮沸法による DNA 抽出を試みた。サルモネラ

及びカンピロバクター菌体からは白金耳 1 μL の 1 ループの大きさほどを懸濁し、DNA 抽出に用いたが、この菌体量で検査に必要量な DNA 量 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ から 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ が抽出できた。RPA 法による、両菌の検出感度を明らかにするために、両菌ともに、DNA 量 5 ng から 0.005 pg の間で RPA 反応を行い、標的遺伝子の増幅を確認した結果、両菌共に、5 ng から 0.5 pg の間で、標的遺伝子の増幅を確認することができた。

・鶏肉増菌培養液

サルモネラもしくはカンピロバクターが分離された鶏肉増菌液 1 mL を用いて、そのまま煮沸法によって、DNA を抽出した。抽出後 RPA 反応を行い、両菌の遺伝子を確認した結果、BPW 増菌液を用いたサルモネラでは、サルモネラ遺伝子は検出されなかった。一方、プレストン増菌液を用いたカンピロバクターでは、カンピロバクター遺伝子は検出された。

D. 考察

1. 核酸等温増幅反応需要調査

DNA 抽出について

DNA 抽出に関して、各検査機関で困っているところが多く、特に公定法で記載されているキット類では加工食品への適用性が低い点で問題視されている点が多くみられた。加工食品では PCR の阻害物質やキットのカラムが詰まってしまう要因ともなる油などの不純物が多く含まれるため、より正確な DNA 抽出法の開発が期待されている。現在検討を進める核酸等温増幅反応で用いられる *Bacillus stearothermophilus* や *Bacillus subtilis* ファージ phi29(ϕ 29)由来の鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼは夾雑物に強いことが知られており、粗抽出 DNA を用いた増幅では従来の PCR による増幅より利点があり、核酸等温増幅法を導入することで時間短縮が見込める可能性がある。

核酸等温増幅反応に対する期待

40%以上の業務が改善されたとした回答者が核酸等温増幅反応に期待するのは多くの場合は迅速性であった。しかし、地方衛研などの担当者为未経験な場合や、感度、精度がまだ明らかになっていない点で導入メリットはわからないと判断されることが多かった。地方衛研では PCR の反応時間は、別の作業に充てられることから、そこまで迅速性の需要が無いことや、別試験を行うとなれば新たに標準手順書を作成する労力が新たに発生すること等、新しい手法に対する不安等も障壁となっていると考えられた。核酸等温増幅反応を実際の試験で使われるようにするには、PCR との性能比較データを示し、同等性を確認することやその手順書を示す必要があると考えられた。

オンサイト検査需要

地方衛研や検疫所の検査では GM 食品やアレルギーのオンサイト検査の需要がほとんどないことがわかった。一部保健所と連携している部署では需要があるが、オンサイト検査が必要な場所等を再度検討する必要がある。例えば事業所での自主検査等まで利用者を拡大する場合は需要があるかもしれない。一方、地方によっては、自然毒に関するオンサイト検査需要が見られたことから、トリカブトやツキヨタケ等の有毒植物やキノコの検査法開発は有用と考えられる。近年の厚生労働科学研究「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」(平成 28~29 年度)及び「植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究」(平成 30 年~令和 2 年度)では、ツキヨタケ、クワウラベニタケ、スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ及びトリカブトに関しては LAMP 法が既に開発されていることから、これらを応用することで実現することが期待される。

マルチプレックス検査需要

現在、公定法では遺伝子のマルチプレックス試験を採用しているものは少ない。それを加味して、需要調査を行ったところ、アレルゲンとして挙げられる特定原材料 8 品目及び GM 大豆の 3 標的、GM とうもろこし 2 標的、キノコなどの有毒植物の一斉検査が挙げられた。また、地方ではクワイズモ等の食中毒事例が多いものも需要がある。しかし、PCR としても 8 品目同時は世界的に見ても例がなく、多くても 4 標的までであることから、まずは 2 標的から確認していく必要があると考えられる。

植物性自然毒データベースに関して

2024 年 2 月に植物性自然毒データベース MsuhPlant はアップデートされた。しかし、まだ知らない試験機関が半数以上と多く、プライマーの情報等も少ないことから、今後の周知活動や、開発された検査法の収載等、定期的なアップデートも必要である。

その他

有毒魚の種判別法に関しても、標的配列の相同性解析のみでは困難な場合があることから、今後より精度の高い検査法へと改良する必要性がある。

今回の調査で、一部の地方衛研等の理化学を専門とした検査者であっても、遺伝子検査の実施件数が少ないことから、分析技術習得、手技伝達や試薬在庫管理の点で多くの悩みを抱えていることが判明し、遺伝子検査技術研修会等も要望が多かった。また、通知試験法内に収載される検査技術バランスの悪化等、過去に収載された試験法が近況を鑑みたアップデートがなされず放置されていることに対する不満等もみられた。公定法としても他の化学物質分析と異なり、遺伝子検査の場合は試薬・機器等が指定されているケースが多いことから、疑問に思われているようであった。しかし、PCR は使用するポリメラーゼによって、結果が異なることもあり、頑健性を担保することは難

しいため、暫くはこの現行の体制が続くのではないかと見られる。

今回のアンケート調査対象には公的な機関のみの需要調査になったが、民間の事業所に需要調査を行うと利便性について違った所見が得られていたかもしれない。公的機関では基本的には通知試験法を採用し、事前に立てた計画に基づいて検査を実施していることから、突発的な対応として核酸等温増幅反応の迅速性が活きる場面が少ないようにも考えられた。

微生物

約 3 割の検査員において、現行の検査法について困ることが有ると答えているが、特に、培養による検査法は、微生物の種類によって、それぞれ培地や条件が違ふこと、さらに、培養法に加えて、遺伝子検査もあることから煩雑で有るとしている。また、特に微生物の分離培養では、培養時間に 48 時間必要とする検査もあるために、困難と感じる要因になっている。マルチプレックスを用いた検査需要に関しては、一度の検査で多検出を可能とすることから、検査量の減少につながり、多くの検査員から望まれていることが容易に理解できた。また、オンサイト需要に関しては、地方衛生研究所では、オンサイト需要は非常に低い結果であった。これは研究環境が整っているために、需要が低いと思われる。一方で食肉検査所や検疫所では、ある程度のオンサイト需要の支持があった。このことから、検査所・研究所の置かれている立場・環境によって、オンサイト需要も違ふということが判明した。

現行の微生物検査法について、改善を望むものとして、病原性大腸菌への要望が多かった。現行の検査法では、他の微生物と比較しても病原性大腸菌は検査事項（菌株同定、O 血清型、病原毒素や因子等）が多いために、必要以上に労力を費やす傾向であることから、要望が多いと考えられる。また、ノロウイルス・カンピロバクターでは、同

定と型別に関する要望が多く、これらの微生物における検査法に関しては、今後、妥当性の有る簡易検査法の構築が必要な分野であると考えられる。

2. DNA 簡易抽出法を用いた検出

とうもろこし粉末から簡易抽出法により得た DNA を標的に検出を試みたところ、既報の方法によって抽出された DNA 溶液において、リアルタイム PCR、LAMP では検出できなかったが、RPA では検出された。また、コーングリッツでは、加熱を行わない既報の方法では RPA でのみ増幅が確認された。スナック菓子では、2つの製品のうち、1つの製品ではどの方法でも検出されなかったが、もう1つの製品で RPA、LAMP では3種類の簡易抽出法全てで、リアルタイム PCR では GenCheck と既報の方法で増幅が確認された。これらの結果より、RPA が食品マトリクスに最も強い核酸等温増幅系であること示唆された。しかし、RPA は蛍光シグナルの強度が LAMP やリアルタイム PCR より弱かったことから、検出方法に関しては今後の検討課題といえる。

加工度の低い食品であれば、市販の粗抽出 DNA 試薬を用いて従来法でも検出可能であったが、PCR の2時間と比較すると、LAMP や RPA を用いて30分弱で検査結果が判明することから、核酸等温増幅反応の迅速性に関する有用性も確認された。

3. RPA 法における菌体及び増菌培養液からの菌体検出

菌体を用いた検出では、サルモネラ及びカンピロバクターともに DNA 量 0.5 pg から 5 ng の範囲で検出が可能であった。また、鶏肉増菌培養液を用いた結果、今回、サルモネラでは一次増菌液で検査を行ったが、不検出であった。この結果から、選択増菌液である二次増菌液を使用すれば、検出は可能となった可能性が考えられる。しかしながら、需要調査結果からも検査法の煩雑は望まれていないことから、来年度、プライマーの改良に

よって、一次増菌液からサルモネラ検出を可能にしたいと考えている。また、カンピロバクターに関しては、選択増菌液であるプレストン培地で検出できたことから、増菌培養を経ればカンピロバクターの検査は十分に可能であることが判明した。今後の課題として、独自プライマー設計と組み合わせによって、*Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* の判別を可能にしたいと考えている。

E. 結論

核酸等温増幅反応の需要調査では、公的機関を対象に行ったことから、通知試験法に対する問題点を確認することができた。核酸等温増幅反応の迅速性の観点から需要は高いことが伺えたが、従来法と同等であることを示すことができない限りは、公的機関での導入は難しいとも考えられた。オンサイト検査、マルチプレックス化はポイントによっては需要があるため、本研究で今後性能及びその有効性を示していくことが重要である。

粗抽出 DNA 溶液の適用性については、市販の簡易抽出試薬と核酸等温増幅反応を組み合わせると PCR と比べて RPA 及び LAMP は迅速に結果が得られることが実証された。さらに RPA は食品マトリクスへの適用範囲が広いことが示唆された。次年度はラテラルフロー法への適用性を評価する予定である。

微生物検査に関して、地方衛生研究所、食品衛生検査所及び検疫所における需要調査の結果では、①約 32%の検査員が現行の検査法に困る事が有る、②約 38%の検査員からマルチプレックス検査に需要が有る、そして、③約 6.5%の検査員で検査法のオンサイト需要が有ると回答を得た。さらに、病原性大腸菌、ノロウイルス、カンピロバクターの検査法に関して、改善を望む検査員が多いことが明らかとなった。これらの要望は、今後の微生物試験法を改善するための有用なデータに成り得るものである。

また、既報をもとに、RPA 法において、サルモネラ及びカンピロバクターを検出した結果、両菌とも DNA 量 0.5 pg から 5 ng で検出が可能であった。さらに、鶏肉増菌液から両菌を検出した結果、BPW 増菌液からサルモネラは不検出であったが、プレストン増菌液からカンピロバクターは検出されたことから、本結果から、RPA 法を用いた今後の検査法への応用が期待された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表・業績

1. Nakayama T, Soga K. Simple and quick detection of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-encoding genes using isothermal nucleic acid amplification techniques. *J Microorganism Control*, 2023; 28(4):145-152.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし